

Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького
Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies

doi:10.15421/nvlvet7911

ISSN 2519–2698 print

ISSN 2518–1327 online

<http://nvlvet.com.ua/>

УДК 636.5: 577.21

Аналіз зв'язку алельних варіантів генів IGF-I, GH та PIT-1 з продуктивними ознаками курей породи бірківська барвіста

Р.О. Кулібаба
romankx@rambler.ru

*Інститут тваринництва НААН,
вул. 7-ї Гвардійської армії, 3, смт. Кулиничі, Харківський р-н, Харківська обл., 62404, Україна*

У статті розглянуто питання зв'язку алельних варіантів генів інсуліноподібного ростового фактору I (IGF-I), гормону росту (GH) та гіпофізарного фактора транскрипції-1 (PIT-1) з показниками яєчної продуктивності курей породи бірківська барвіста. З використанням методів класичної ПЛР та ПЛР-ПДРФ визначали PstI-поліморфізм у 5'UTR фрагменті гену IGF-I; HinfI-поліморфізм у промоторному фрагменті IGF-I; AluI-поліморфізм у четвертому інтроні гена GH; наявність/відсутність інсерції у другому інтроні гена PIT-1. В результаті проведених досліджень виявлено вірогідні відмінності в значеннях маси яєць на 30 тижднів життя за HinfI-поліморфізмом у промоторному фрагменті локусу інсуліноподібного ростового фактору I. Для особин з генотипом C/C характерні більші значення даного показника в порівнянні з A/A ($51,7 \pm 0,61$ проти $47,9 \pm 0,92$ відповідно). За PstI-поліморфізмом у 5'UTR гена інсуліноподібного ростового фактору I показано перевагу значення кількості знесених яєць за 12 тижнів продуктивності для особин з генотипом C₁C₁ порівняно з C₂C₂ ($65,2 \pm 3,77$ проти $60,9 \pm 1,33$), однак у даному випадку відмінності невірогідні, що може бути пов'язано з малою кількістю особин C₁C₁ (12). За іншими локусами вірогідних відмінностей за визначеними показниками не виявлено.

Ключові слова: кури, поліморфізм, локус, алель, ген, генотип, молекулярно-генетичні маркери, популяція, лінія, продуктивність.

Анализ связи аллельных вариантов генов IGF-I, GH и PIT-1 с продуктивными признаками кур породы борковская барвистая

Р.А. Кулибаба
romankx@rambler.ru

*Інститут животноводства НААН,
ул. 7-й Гвардейской армии, 3, пгт. Кулинич, Харьковський р-н, Харьковская обл., 62404, Украина*

В статье рассмотрены вопросы связи аллельных вариантов генов инсулиноподобного ростового фактора I (IGF-I), гормона роста (GH) и гипофизарного фактора транскрипции-1 (PIT-1) с показателями яичной продуктивности кур породы борковская барвистая. С использованием методов классической ПЦР и ПЦР-ПДРФ определяли PstI-полиморфизм в 5'UTR фрагменте гена IGF-I; HinfI-полиморфизм в промоторном фрагменте IGF-I; AluI-полиморфизм в четвертом интроне гена GH; наличие/отсутствие инсерции во втором интроне гена PIT-1. В результате проведенных исследований выявлены достоверные различия в значениях массы яйца на 30 недель жизни по HinfI-полиморфизму в промоторном фрагменте локуса инсулиноподобного ростового фактора I. Для особей с генотипом C/C характерны большие значения данного показателя по сравнению с A/A ($51,7 \pm 0,61$ против $47,9 \pm 0,92$ соответственно). По PstI-полиморфизму в 5'UTR гена инсулиноподобного ростового фактора I показано преобладание значения количества снесенных яиц за 12 недель продуктивности для особей с генотипом C₁C₁ по сравнению с C₂C₂ ($65,2 \pm 3,77$ против $60,9 \pm 1,33$), однако в данном случае различия не достоверны, что может быть связано с недостаточным количеством особей генотипа C₁C₁ (12). По другим локусам достоверных различий не выявлено.

Citation:

Kulibaba, R.O. (2017). Association of allele variants of IGF-I, GH and PIT-1 genes with production traits of Birkivska Barvista chicken breed. *Scientific Messenger LNUVMB*, 19(79), 53–57.

Ключевые слова: куры, полиморфизм, локус, аллель, ген, генотип, молекулярно-генетические маркеры, популяция, линия, продуктивность.

Association of allele variants of IGF-I, GH and PIT-1 genes with production traits of Birkivska Barvista chicken breed

R.O. Kulibaba
romankx@rambler.ru

*Institute of animal science NAAS,
7th Guards Army Str., 3, p.d. Kulinichi, Kharkiv region, 62404, Ukraine*

The article considers the questions about association between allelic variants of insulin-like growth factor I (IGF-I), growth hormone (GH) and pituitary transcription factor-1 (PIT-1) genes with the egg productivity of the Borkovskaya Barvistaya chicken breed. Using classical PCR and PCR-RFLP methods, the PstI-polymorphism in the 5'UTR fragment of the IGF-I gene, HinfI-polymorphism in the promoter fragment of IGF-I gene, AluI-polymorphism in the fourth intron of the GH gene and indel polymorphism in the second intron of the PIT-1 gene were determined. As a result of the studies the significant differences in egg weight values on 30 weeks of life for HinfI-polymorphism in the promoter fragment of the IGF-I gene were revealed. For individuals with the C/C genotype was specific the large values of this index compared to A/A ($51,7 \pm 0,61$ vs. $47,9 \pm 0,92$ respectively). For PstI-polymorphism in the 5'UTR of the IGF-I gene was shown the prevalence in the number of eggs for 12 weeks of productivity for individuals with the C_1C_1 genotype compared to C_2C_2 ($65,2 \pm 3,77$ vs. $60,9 \pm 1,33$), but in this case the differences are not significantly, what can be caused by a small number of individuals with C_1C_1 genotype (12). There were no significant differences for other loci.

Key words: chicken, polymorphism, locus, allele, gene, genotype, molecular genetic markers, population, line, productivity.

Вступ

Вивчення зв'язку різних алелів функціональних генів з господарсько-корисними ознаками відноситься до однієї з базових складових маркер-асоційованої селекції (MAS) у тваринництві в цілому та в птахівництві зокрема (Fulton, 2008; Wolc, 2014). У зв'язку з цим до актуальних питань відноситься завдання визначення поліморфних варіантів різних генів-кандидатів, функціонування яких пов'язано з проявом господарсько-корисних ознак (Khlestkina, 2014). До одних із найбільш цікавих генів-кандидатів, що пов'язані з показниками яєчної продуктивності курей відносяться гени інсуліноподібного ростового фактору I, гормону росту та гіпофізарного фактора транскрипції-1 (Saxena et al., 2009).

Інсуліноподібний ростовий фактор I відноситься до поліпептидів, що бувають участь у забезпеченні росту та диференціювання клітин і тканин організму (Li et al., 2008). Здійснює практично усі функції соматотропного гормону в периферійних тканинах, що робить його, поряд з гормоном росту, одним із найбільш перспективних об'єктів у сучасній селекції птиці.

Гормон росту – один із найбільш багатофункціональних гормонів організму тварин та птиці (Shahnaz et al., 2008). Бере участь у забезпеченні найширшого спектру фізіологічних функцій. Виявлені алельні варіанти, що виникають внаслідок варіативності послідовностей залишків азотистих основ у ланцюгу ДНК різних фрагментів гена (інтрони, екзони тощо), які пов'язані з такими господарсько-корисними ознаками птиці, як яєчна та м'ясна продуктивність, якість шкаралупи, а також з резистентністю до захворювань (Liu et al., 2001; Nie et al., 2005; Enayati and Rahimi-Mianji, 2009).

Гіпофізарний фактор транскрипції-1 – поліпептид, що бере участь у регуляції транскрипції генів, які кодують гормон росту, пролактин, родину трансформуючих ростових факторів та інше. Ген PIT-1 відноситься до одного із найбільш перспективних генів-кандидатів, алельні варіанти якого пов'язані з проявом різних господарсько-корисних ознак (Bhattacharya et al., 2012).

Дослідження щодо вивчення зв'язку різних алелів окремих генів-кандидатів являють собою досить рутину практику сучасної зарубіжної генетики та селекції птиці, однак в Україні ще недостатньо розповсюджені, що в цілому й визначило відставання показників продуктивності курей вітчизняної селекції. Запропонована робота, яка є невід'ємною складовою цілого комплексу досліджень із застосування молекулярно-генетичних маркерів у селекції курей вітчизняних порід, спрямована на подолання даного недоліку.

Раніше у роботах автора було розглянуто питання вивчення основних генетико-популяційних параметрів популяції курей породи бірківська барвіста за сукупністю молекулярно-генетичних маркерів, насамперед PCR-RFLP та Indel. Мета даної роботи – вивчити зв'язок поліморфізму в локусах інсуліноподібного ростового фактора I, гормону росту та гіпофізарного фактора транскрипції-1 з показниками яєчної продуктивності курей породи бірківська барвіста лінії А.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили у лабораторії профілактики захворювань птиці та молекулярної діагностики Державної дослідної станції птахівництва НААН, а також у лабораторії молекулярно-генетичних і фізіолого-біохімічних досліджень у тваринництві Інституту тваринництва НААН.

Для проведення досліджень було використано птицю української селекції – кури яєчного напрямку продуктивності, лінії А, породи бірквіська барвіста ($n = 100$). Курей утримували у віварії лабораторії (популяція 2014 року). В якості джерела ДНК використовували кров птиці.

Як об'єкти досліджень було обрано локуси, алельні варіанти яких пов'язані з показниками продуктивності птиці (згідно з літературними джерелами), – гени інсуліноподібного ростового фактора I, гормону росту та гіпофізарного фактору транскрипції-1.

Поліморфізм локусу інсуліноподібного ростового фактора I (*IGF-I*) визначали за допомогою аналізу двох мутацій (SNP) у сайтах рестрикції для відповідних рестриктаз. У першому випадку поліморфізм *IGF-I* визначали за наявністю/відсутністю сайту для PstI у 5'UTR фрагменті гену (Nagaraja et al., 2000; Li et al., 2010). У другому випадку – за наявністю/відсутністю сайту для HinfI у промоторі (Zhou et al., 2005). Поліморфізм у четвертому інтроні гена гормону росту курей (*GH*) визначали на підставі результатів власних досліджень – за допомогою аналізу наявності/відсутності сайту для AluI (Kulibaba et al., 2017). На відміну від усіх вищеперерахованих, алельні варіанти гена PIT-1 пов'язані не з точковою мутацією (SNP) в сайті рестрикції, а з наявністю/відсутністю інсерції, розміром 57 п. н., у другому інтроні гену (маркер класу Indel) (Nie et al., 2008). Генотипування особин у даному випадку проводили з використанням аналізу продуктів ампліфікації (у всіх інших випадках аналізували продукти рестрикції).

Для проведення ампліфікації використовували відповідні для кожного локусу олігонуклеотиди. ПЛР

проводили за допомогою реагентів DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific) з використанням програмуемого термоциклера «Терцик» («ДНК-технологія», Росія) за відповідними програмами.

Обробку ампліфікованих фрагментів ендонуклеазами рестрикції проводили згідно з інструкціями виробника (FastDigest, Thermo Scientific). Генотипування особин за кожним із локусів проводили через порівняння довжин ампліфікованих/рестрикційних фрагментів на електрофореграмах.

Після проведення процедури генотипування окремих особин на підставі отриманих даних проводили облік показників яєчної продуктивності курей: En12 (Egg number) – кількість яєць за 12 тижнів продуктивності (23–34 тижні життя); En40 – кількість яєць за 40 тижнів продуктивності (23–62 тижні життя); Ew30 (Egg weight) – маса яєць на 30 тижнів життя; Ew52 – маса яєць на 52 тижнів життя. Зв'язок алельних варіантів поліморфних локусів з показниками продуктивності курей оцінювали шляхом порівняння середніх значень за різними генотипами з використанням t-критерію Стюдента.

Результати та їх обговорення

За результатами генетико-популяційних досліджень показано, що у дослідній популяції курей локуси *IGF-I*, *GH* та *PIT-1* є поліморфними. У наявності особини усіх можливих генотипів (у випадку двохалельних систем їх три) за кожним із генів. Однак співвідношення гомозиготних та гетерозиготних генотипів у кожному із локусів істотно відрізняються, що відображено на рисунку 1.

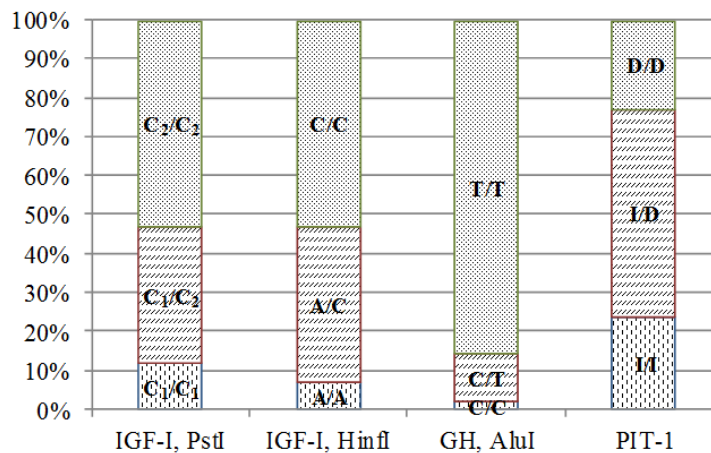


Рис. 1. Співвідношення частот генотипів за локусами *IGF-I*, *GH* та *PIT-1* у дослідній популяції курей

Співвідношення частот генотипів при дослідженні зв'язку різних алельних варіантів певних локусів з продуктивними ознаками курей має принципове значення для статистичної обробки результатів досліджень. Кількість особин різних генотипів, насамперед гомозиготних, повинно бути достатнім для проведення статистичного аналізу. В дослідній лінії курей за результатами генетико-популяційних досліджень не виявлено достатньої для проведення досліджень кількості особин з генотипом C/C за локусом *GH*, внаслідок

незначного значення частоти алеля C (0,08). Тому аналіз показників продуктивності курей породи бірквіська барвіста за даним локусом проводили тільки між особинами з генотипами C/T та T/T. За всіма іншими локусами аналізували показники різних гомозиготних та гетерозиготних особин у межах конкретних генів.

У таблиці подано дані щодо показників яєчної продуктивності особин різних генотипів дослідної популяції курей.

Таблиця 1

Показники яєчної продуктивності курей породи бірківська барвіста лінія А за локусами IGF-I, GH та PIT-1 (M ± m)

Локус	Генотип	Показники продуктивності			
		En ₁₂ , шт.	En ₄₀ , шт.	Ew ₃₀ , г	Ew ₅₂ , г
IGF-I PstI	C ₁ /C ₁	65,2 ± 3,77 ^a	204,4 ± 9,63 ^a	52,9 ± 1,34 ^a	58,9 ± 1,68 ^a
	C ₁ /C ₂	61,0 ± 2,49 ^a	203,9 ± 5,66 ^a	54,2 ± 1,57 ^a	58,6 ± 0,99 ^a
	C ₂ /C ₂	60,9 ± 1,33 ^a	203,7 ± 3,37 ^a	52,5 ± 1,12 ^a	57,1 ± 0,58 ^a
IGF-I HinfI	A/A	62,1 ± 4,14 ^a	206,3 ± 12,21 ^a	47,9 ± 0,92 ^a	57,6 ± 1,81 ^a
	A/C	61,6 ± 1,51 ^a	201,9 ± 4,62 ^a	51,5 ± 0,89 ^b	57,2 ± 0,69 ^a
	C/C	64,2 ± 1,22 ^a	206,5 ± 3,35 ^a	51,7 ± 0,61 ^b	58,4 ± 0,74 ^a
GH AluI	C/T	60,8 ± 2,44 ^a	202,3 ± 7,09 ^a	51,8 ± 2,25 ^a	58,0 ± 1,06 ^a
	T/T	63,1 ± 1,08 ^a	204,8 ± 3,03 ^a	52,6 ± 0,76 ^a	57,5 ± 0,55 ^a
PIT-1	I/I	60,8 ± 2,33 ^a	203,4 ± 6,71 ^a	51,2 ± 1,38 ^a	57,9 ± 1,19 ^a
	I/D	64,4 ± 1,43 ^a	210,7 ± 3,79 ^a	51,1 ± 0,83 ^a	58,2 ± 0,77 ^a
	D/D	62,2 ± 1,51 ^a	205,2 ± 4,21 ^a	51,8 ± 0,67 ^a	57,1 ± 0,76 ^a

Примітка: a, b – відмінності вірогідні (P < 0,01) у межах локусу

В результаті проведених досліджень з'ясовано, що за PstI-поліморфізмом у локусі IGF-I вірогідних відмінностей за дослідженими показниками між особинами різних генотипів не виявлено. При цьому виявлено перевагу значення кількості знесених яєць за 12 тижнів продуктивності у особин з генотипом C₁C₁ порівняно з C₂C₂ (65,2 ± 3,77 проти 60,9 ± 1,33), однак відмінності не вірогідні, що може бути пов'язано з малою кількістю особин C₁C₁ (12). Гетерозиготні особини за визначеними показниками займають проміжне положення.

Своєю чергою за HinfI-поліморфізмом локусу IGF-I виявлено вірогідні відмінності у значеннях маси яйця на 30 тижнів життя. Для особин з генотипом C/C характерні більші значення даного показника порівняно з A/A. За іншими показниками істотних відмінностей між особинами різних генотипів не виявлено.

За AluI-поліморфізмом у четвертому інтроні гену гормону росту вірогідних відмінностей за показниками яєчної продуктивності також не виявлено. При цьому, за винятком показника маси яйця на 52 тижнів життя, в цілому превалюють особини з генотипом TT, що найбільш виражено за кількістю яєць за 12 тижнів продуктивного періоду. При цьому слід враховувати той факт, що порівняння проводяться не між показниками протилежних гомозиготних особин (C/C та T/T), а між гетерозиготами C/T та гомозиготами T/T. Беручи до уваги кодомінантний тип наслідування у даному випадку, можливо припустити, що значення показників особин з генотипами C/C та T/T будуть більш виражено відрізнятися.

За локусом PIT-1 не виявлено виражених відмінностей за значеннями показників продуктивності між особинами з різними генотипами. Однак у даному випадку, на відміну від усіх інших, значення показників гетерозиготних особин перевищують такі у гомозигот (за винятком Ew₃₀), тимчасом як у інших локусах гетерозиготи, як правило, займають проміжне положення.

Висновки

В результаті проведених досліджень виявлено вірогідні відмінності у значеннях маси яйця на 30 тижнів життя за HinfI-поліморфізмом у промоторному фрагменті локусу інсуліноподібного ростового фактора I. Для особин з генотипом C/C є характерними більші значення даного показника порівняно з A/A (51,7 ± 0,61 проти 47,9 ± 0,92 відповідно). За PstI-поліморфізмом у 5'UTR гену інсуліноподібного ростового фактору I показано переважання значення кількості знесених яєць за 12 тижнів продуктивності для особин з генотипом C₁C₁ порівняно з C₂C₂ (65,2 ± 3,77 проти 60,9 ± 1,33), однак у даному випадку відмінності не вірогідні, що може бути викликано незначною кількістю особин з генотипом C₁C₁ (12). За іншими локусами вірогідних відмінностей за визначеними показниками не виявлено.

Результати досліджень можуть бути використані для проведення подальшої селекційної роботи з популяцією курей породи бірківська барвіста лінії А з метою отримання мікроліній з бажаними генотипами за генами інсуліноподібного ростового фактора I, гормону росту та гіпофізарного фактора транскрипції-1.

Бібліографічні посилання

- Wolc, A. (2014). Understanding genomic selection in poultry breeding. *World's Poultry Sci. J.* 70, 309–314.
- Fulton, J.E. (2008). Molecular genetics in a modern poultry breeding organization. *World's Poultry Sci. J.* 64, 171–176.
- Khlestkina, E.K. (2014). Molecular markers in genetic studies and breeding. *Russ J Genetics.* 4(3), 236–244.
- Saxena, V.K., Sachdev, A.K., Gopal, R., Pramod, A.B. (2009). Roles of important candidate genes on broiler meat quality. *World's Poultry Sci. J.* 65, 37–50.
- Li, H., Zhu, W., Chen, K., Wu, X., Tang, Q., Gao, Y. (2008). Associations between GHR and IGF-1 gene polymorphisms, and reproductive traits in Wenchang chickens. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 32(4), 281–285.
- Shahnaz, S., Shadma, F., Rank, D.N., Khanna, K., Joshi, C.G. (2008). Growth hormone gene polymorphism

- and its correlation with different traits in Bantam and Leghorn chicken. *Indian journal of poultry science*. 43(2), 123–127.
- Enayati, B., Rahimi-Mianji, G. (2009). Genomic growth hormone, growth hormone receptor and transforming growth factor β -3 gene polymorphism in breeder hens of Mazandaran native fowls. *African journal of biotechnology*. 8(14), 3154–3159.
- Nie, Q., Lei, M., Ouyang, J., Zenq, H., Yang, G., Zhang, X. (2005). Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography. *Genet. Sel. Evol.* 37(3), 339–360.
- Liu, H.C., Kung, H.J., Fulton, J.E., Morgan, R.W., Cheng, H.H. (2001). Growth hormone interacts with the Marek's disease virus SORF2 protein and is associated with disease resistance in chicken. *PNAS USA*. 98(16), 9203–9208.
- Bhattacharya, T.K., Chatterjee, R.N., Priyanka, M. (2012). Polymorphisms of Pit-1 gene and its association with growth traits in chicken. *Poultry Science*. 91, 1057–1064.
- Nagaraja, S.C., Aggrey, S.E., Yao, J., Zadworny, D., Fairfull, R.W., Kuhnlein, U. (2000). Trait association of a genetic marker near the IGF-I gene in egg-laying chickens. *J. Hered.* 91, 150–156.
- Li, H., Zhu, W., Chen, K., Song, W., Shu, J., Han, W. (2010). Effects of the polymorphisms of GHR gene and IGF-1 gene on egg quality in Wenchang chicken. *Research Journal of Poultry Sciences*. 3(2), 19–22.
- Zhou, H., Mitchell, A.D., McMurtry, J.P., Ashwell, C.M., Lamont, S.J. (2005). Insulin-Like Growth Factor-I Gene Polymorphism Associations with Growth, Body Composition, Skeleton Integrity, and Metabolic Traits in Chickens. *Poultry Science*. 84, 212–219.
- Kulibaba, R.A., Liashenko, Y.V., Yurko, P.S. (2017). Novel AluI-polymorphism in the fourth intron of chicken growth hormone gene. *Cytol. Genet.* 51(1), 54–59.
- Nie, Q., Fang, M., Xie, L., Zhou, M., Liang, Z., Luo, Z., Wang, J., Bi, W., Liang, C., Zhang, W., Zhang, X. (2008). The PIT1 gene polymorphisms were associated with chicken growth traits. *BMC Genet.* 9, 20–24.

Received 11.09.2017

Received in revised form 30.09.2017

Accepted 3.10.2017